

BULLETIN

DU

DÉPARTEMENT DE L'AGRICULTURE

AUX

INDES NÉERLANDAISES.

N^o. XXX.

Microbiologie IV.

BUITENZORG,
IMPRIMERIE DU DÉPARTEMENT
1909.

Les Bactéries thermophiles dans les Tropiques.

P A R

E. DE KRUIJFF

BACTÉRIOLOGUE.

Introduction.

En 1879, Miquel (11) isola de l'eau de Seine une bactérie, qui avait des qualités fort remarquables. Cette bactérie, nommée par Miquel *Bacillus thermophilus*, ne croissait plus à des températures inférieures à 42°C. et avait sa température maximum de développement à 72°C. Elle croissait le mieux à des températures de 60—70°C.

En 1881, Globig (5) publia une communication sur les bactéries thermophiles, dont il avait isolé quelques espèces.

Sames (13) en 1900 et Rabinowitz (12) en 1895 publièrent quelques recherches sur les thermophiles. Parmi les publications parues dans les derniers temps sur ces bactéries, je ne mentionnerai que celles de Blau (2) en 1906 et celle de Miehe (10) en 1907. Ce dernier auteur donne un résumé complet de la littérature.

La quantité d'espèces de bactéries thermophiles, isolées par les différents auteurs, n'est pas grande. En général, les descriptions, qui sont données de ces organismes sont si incomplètes, qu'il est impossible de leur rapporter les espèces étudiées ultérieurement. Il est presque certain que des bactéries identiques ont été à plusieurs reprises décrites comme différentes. Une heureuse exception à cette règle est fournie par Blau (l.c.) et par Miehe (l.c.), dont les descriptions ne laissent rien à désirer.

Dans sa publication intitulée: „die Selbsterhitzung des Heus,” Miehe répartit les bactéries selon leur température de croissance maximum en quatre groupes. Cette division me paraît si judicieuse, que je l'ai adoptée pour la présente publication:

1° Les bactéries qui croissent à des température de 60° à 70°C., c'est à dire plus élevées que la température de coagulation des albumines; Miehe leur donne le nom de: *Bactéries orthothermophiles*.

2° Les bactéries dont le maximum de croissance est tout près de 50—55°C., mais qui croissent assez bien à la température ordinaire. Elles sont nommées: *Bactéries thermotolérantes*.

3° Les bactéries dont le maximum de croissance est entre 50° et 55°C., qui croissent le mieux à cette température, mais qui, à la température ordinaire, ne croissent que très lentement. Ce sont les *Bactéries psychrotolérantes*.

4° Les bactéries dont le maximum est près de 35°C., les *Bactéries psychrophiles*.

Quant au rôle que les bactéries thermophiles jouent dans la nature, plusieurs des auteurs nommés ci-dessus émettent des suppositions souvent assez hasardées. Je reviens plus loin sur cette question.

On n'a encore rien publié sur les bactéries thermophiles des Tropiques et sur le rôle qu'elles jouent dans la nature. Si l'on considère que les températures moyennes sont plus élevées, que l'action calorifique du soleil est plus intense, etc., il est à prévoir que les bactéries thermophiles trouvent, dans les contrées tropicales, les conditions les plus favorables à leur développement et qu'elles remplissent un rôle important dans les divers processus de décompositions bactériennes. Nous discuterons plus tard jusqu'à quel point cette supposition est fondée.

Sur la méthode d'isoler les bactéries thermophiles.

Comme les recherches sur les bactéries thermophiles doivent être faites à des températures bien plus élevées que celles appliquées d'ordinaire pour les cultures dans les laboratoires, les méthodes ordinaires ne pouvaient donner que des résultats insuffisants.

En particulier, les milieux de culture gélosés présentaient à ces températures de 50—73°C. beaucoup de difficultés. L'évaporation de l'eau était si forte que, déjà après quelques heures, la gélose était tout-à-fait desséchée. En outre, les acides et les alcalis, même à des concentrations peu élevées, avaient une action décomposante sur la gélose. Après des expériences nombreuses, j'obtins finalement des résultats tout-à-fait suffisants en employant, au lieu des boîtes de Pétri ordinaires, des boîtes dont le couvercle était creusé d'une rainure usée à l'émeri et en plaçant ces boîtes dans le thermostat, retournées, c'est-à-dire avec leur couvercle en bas.

Les géloses de nutrition contenaient au plus 2% de gélose; un pourcentage plus élevé ne donnait pas de notables avantages. Je tâchai toujours de travailler avec des géloses presque neutralisées. En milieux liquides, pour empêcher l'évaporation, les fioles étaient toujours fermées avec un bouchon. Quand on a soin de suivre exactement ces indications, la culture des bactéries thermophiles ne donne pas les moindres difficultés et marche aussi bien que la culture des bactéries psychrophiles aux températures ordinaires.

Au cours de mes recherches, il m'apparut bientôt, que les bactéries thermophiles existaient dans la nature tropicale non seulement en un grand nombre d'individus, mais aussi en un grand nombre d'espèces. Pour les isoler, j'employais aussi bien la semence directe sur des plaques de gélose de compositions différentes, que la culture élective.

Pour isoler des bactéries sécrétant l'amyrase, je suivais les méthodes indiquées dans notre Bulletin No III, pages 5 et 6 (7) et pour isoler des bactéries sécrétant la lipase (*les Lipobacter*) les méthodes indiquées dans le Bulletin No IX (8) pag. 4. Pour démontrer l'action liquéfiante, j'employais la gélose de caséine, décrite dans notre Bulletin No. III pag. 9 (7).

Pour l'isolement des bactéries oligo-nitrophiles, je suivais les méthodes de Beyerinck (1) et de Winogradsky (14), et pour les bactéries dénitrifiantes les méthodes de Van Iterson (6). La rapidité, avec laquelle les spores étaient tuées par une température de 100°C., fut déterminée suivant le procédé d'Arthur Meyer (9).

Les bactéries thermophiles isolées.

En appliquant les méthodes indiquées ci-dessus, j'ai analysé au point de vue de la présence éventuelle des bactéries thermophiles, un grand nombre d'échantillons de provenances diverses. Les échantillons de terre furent récoltés par exemple aussi bien dans le forêt et dans d'autres sols non cultivés, que dans des sols cultivés depuis assez longtemps. J'ai tâché d'isoler aussi ces bactéries de l'eau de rivière et de l'air.

Les cultures électives avaient toujours lieu à DEUX températures, soit 55° et 65°C.

Comme je l'ai déjà dit, la quantité des bactéries thermophiles, isolées de ces divers matériaux était très grande et non seulement

en ce qui concerne la quantité des individus, mais aussi au point de vue de la quantité des espèces. Je n'ai pas rencontré un seul échantillon, même d'air, dans lequel elles n'existaient pas en nombre très considérable.

J'ai relevé déjà dans l'introduction ce fait que la description donnée dans la littérature des espèces isolées en Europe, est si insuffisante, qu'il est impossible de décider, si ces bactéries se trouvent aussi dans les contrées tropicales. Quant aux espèces bien décrites par Blau (l.c.): *Bacillus robustus*, *Bacillus calidus*, *cylindricus* et *Bacillus tostus* et celle de Miehe (l.c.) *Bacillus calfactor*, je n'ai pas encore réussi jusqu'ici à les isoler.

Je ne crois pas nécessaire de donner une énumération de toutes les espèces isolées par moi; à la fin de cette publication, je ne donnerai la description que des espèces, qui m'ont semblé les plus intéressantes.

Cependant, je ferai ici quelques remarques générales, qui sont applicables à toutes les espèces de ces organismes si intéressants.

En premier lieu, il faut remarquer que toutes ces bactéries, *sans exception*, forment des spores. La plupart des espèces ont leur spore à l'extrémité du bâtonnet. Toutes les espèces ont la forme de bâtonnet; je n'ai jamais pu observer ni microcoques, ni spirilles, etc.

Toutes les espèces étaient facultativement anaérobies; je n'ai pas pu isoler d'anaérobies pures, ni d'aérobies pures.

De plusieurs groupes de bactéries, je n'ai pas pu isoler une seule espèce. Ainsi les cultures électives de bactéries dénitrifiantes, suivant les méthodes de Van Iterson, n'ont pas eu le moindre succès. Il est vrai que les cultures électives de ces bactéries, même aux températures ordinaires, donnent beaucoup de difficultés et ne réussissent que très rarement. La culture élective avec le bouillon-nitrate a pourtant bien réussi et l'écume caractéristique se formait aussi à la température de 65°C. Il m'a été, jusqu'ici, impossible d'obtenir la nitrification des solutions de sels d'ammoniaque à des températures de 45°C. et au-dessus.

Pour les bactéries fixant l'azote libre de l'atmosphère, j'employai et la solution de mannite de Beyerinck (1) et la solution de glucose de Winogradsky (14). La culture des bactéries anaérobies

avec la solution de glucose n'eut pas la moindre succès: il était même impossible de faire fermenter le glucose.

La solution de mannite, ensemencée avec du sol et cultivée à une température de 55°C. devient opaque après quelques jours et un peu visqueuse. Les bactéries isolées de cette solution et ensemencées de nouveau dans une solution de mannite libre d'azote fixé, se développaient bien visiblement, mais la quantité fixée d'azote fut si petite, qu'il était impossible de la déceler suivant la méthode de Kjeldahl.

De même, il me fut impossible d'isoler les levures thermophiles avec de l'extrait de malt, concentré ou dilué.

Il était bien curieux de constater aussi, qu'il était impossible d'isoler des bactéries fermentant les solutions de sucres comme le glucose, le saccharose, etc. Il en était de même avec le bouillon-glucose. Quelquefois, en ensemencant avec de grandes quantités de terre, on voyait, après un temps de culture de 24 heures, quelques bulles de gaz monter du liquide trouble; mais avec les cultures pures des bactéries isolées, je n'obtenais jamais de fermentation. A la température de 50°C., il se formait toujours de l'acide lactique dans les solutions de glucose.

Les diastases sécrétées par les bactéries thermophiles.

La recherche des diastase sécrétées par les bactéries thermophiles suivant les méthodes exposées ci-dessus, ne présentait pas de difficultés.

Les champs de diffusion des diverses diastases de sécrétion sur la gélose, étaient aussi distinctes que sur des cultures faites aux températures ordinaires.

Pour quelques diastases, par exemple la lipase, il me sembla que le champ de diffusion du ferment devenait plus petit aux températures plus élevées.

Il est fort intéressant de constater que les diastases peuvent supporter des températures aussi élevées, sans que leur activité diminue (Voyez: Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzymen).

L'influence de la nutrition des bactéries à amylase sur la sécrétion de la diastase était aussi prononcée à la température de culture des thermophiles. Les deux phases de l'action de l'amylase: la liquéfaction et la saccharification (Voyez notre Bulletin N° III) étaient, aussi à ces températures, très faciles à distinguer.

Naturellement la rétrogradation de l'amidon n'a pas lieu à ces températures élevées.

La lipase sécrétée par les *Lipobacter thermophiles*, hydrolysait non seulement la butyrine, mais assez facilement aussi les glycérides d'acides gras de poids moléculaire plus élevé. Tous les *Lipobacter* que nous avons pu isoler jusqu'ici (Bulletin IX, l.c.) ne formaient pas de spores, tandis que — et cela est très remarquable — les *Lipobacter thermophiles* forment *tous* des spores.

La faculté de sécréter des diastases est très commune chez les bactéries thermophiles et ce fait montre déjà qu'elles doivent jouer quelque rôle important dans la nature. Plusieurs des espèces de ces organismes secrètent plus d'une diastase.

Le rôle des bactéries thermophiles dans les Tropiques.

Comme je l'ai dit déjà dans l'introduction, Miehle a donné dans son intéressante publication (l.c.) quelques considérations sur la dispersion des bactéries thermophiles dans le sol et sur le rôle qu'elles jouent dans la nature. Il tire la conclusion que les bactéries thermophiles ne trouvent des conditions de température favorables à leur croissance que dans les fumiers et sur les points exposés à l'action directe de la chaleur du soleil.

Il démontre que la supposition de Rabinowitz, que les bactéries thermophiles *aérobies* peuvent vivre à des températures plus basses que leur minimum dans des conditions *anaérobies*, n'est pas fondée. J'ai répété ces expériences et je ne puis que confirmer ces résultats.

Sames (l.c.) donne quelques chiffres sur la température mesurée directement au soleil pendant l'été. Quoique ces températures soient assez élevées, elles ne règnent que quelques heures par jour et quelques jours par année seulement. Il résulte de ces données, que la chaleur directe du soleil dans les régions tempérées ne peut avoir une grande influence sur la reproduction des bactéries thermophiles. C'est dans les fumiers seulement, où la température monte jusqu'à 70°—80°C., que les bactéries thermophiles trouvent, en Europe, les conditions nécessaires à leur développement.

Il va sans dire que les circonstances sont toutes différentes sous les Tropiques. Comme en Europe, les fumiers ici aussi seront des substratum où les bactéries thermophiles pourront se

développer très bien; mais en outre leur multiplication principale aura lieu, comme nous le montrerons, dans la terre même et sous l'action directe de la chaleur solaire. Dans les pays tropicaux, l'insolation n'est pas seulement plus intensive, mais aussi bien plus constante qu'en Europe. C'est ainsi que nous avons, dans les couches superficielles du sol, pendant des heures entières et pendant toute l'année, des températures qui ne règnent en Europe qu'exceptionnellement pendant un temps très court et en été seulement.

Dans le tableau suivant, on trouve des chiffres de températures qui confirment ce que je viens de dire. La température a été prise toutes les heures sur plusieurs thermomètres. Le thermomètre No. 1 avait un réservoir noirci, inclus dans un petit ballon vide d'air. Le thermomètre No. 2 donnait les températures dans un flacon vide, enveloppé de papier noir. Le thermomètre No. 3 était placé dans un flacon de 50 c.c. entièrement rempli d'eau, où était dissoute de la boue noir, dont une partie restait en suspension dans le liquide. Le thermomètre No. 4 était placé dans un flacon identique, mais dont la boue noire était remplacée par de la boue grise. Les thermomètres et les flacons étaient placés en plein air sur une petite pelouse et exposés de tous les côtés au vent.

TABLEAU DES TEMPERATURES.

20 Août 1908.

Heures.	8	9	10	11	12	1	Moyenne.
Thermomètre No. 1	42	46	51	47	50	52	48
Thermomètre No. 2	37	45	49	46	48	47	35
Thermomètre No. 3	44	50	55	46	49	51	49

TABLEAU DES TEMPERATURES.

21 Août 1908.

Heures.	8	9	10	11	12	1	Moyenne.
Thermomètre No. 1	34	40 ^{1/2}	45	48	48 ^{1/2}	48	44
Thermomètre No. 2	32	45	53	47	45	46	45
Thermomètre No. 3	40	52	58	47	48	48 ^{1/2}	49

22 Août 1908.

Heures.	8	9	10	11	12	1	2	Moyenne.
Thermomètre No. 1	35	41	45	48	49	49 ^{1/2}	49	45
Thermomètre No. 2	40	49	42	45	48	48	48	46
Thermomètre No. 3	48	52	43	47	40	50	46	48

24 Août 1908.

Heures	8	9	10	11	12	1	2	3	4	Moyenne.
Thermomètre No. 1	35	41	45	48	50	57 ^{1/2}	50	47	43	46
Thermomètre No. 2	40	50	57	54	54	46	46	47	43	49
Thermomètre No. 3	46	52	62	57	57	52	50	49	44	52
Thermomètre No. 4	42	47	47	60	43	45	46	47	38	46

TABLEAU DES TEMPERATURES.

26 Août 1908.

Heures.	8	9	10	11	12	1	Moyenne.
Thermomètre No. 1	34	41	47	51	46	45	44
Thermomètre No. 2	28 ^{1/2}	34 ^{1/2}	45	54	45	45	45
Thermomètre No. 3	34	43	50	45	45	45	44
Thermomètre No. 4	33	40	47	45	42	42	42

28 Août 1908.

Heures.	8	9	10	11	12	1	Moyenne.
Thermomètre No. 1	36 ^{1/2}	43	46	48	41	52	44
Thermomètre No. 2	34	51	54	43	39	48	45
Thermomètre No. 3	43 ^{1/2}	56 ^{1/2}	58	53	40	54	50
Thermomètre No. 4	30	44	49	43	40	40	41

Les brusques différences de températures sont causées par le vent. Des thermomètres placés à l'abri des courants d'air, auraient donné sans doute des températures plus régulières.

Prenons comme exemple le 24 Août. Les lectures de la température avaient lieu de 8 heures du matin à 4 heures de l'après-midi. Le flacon rempli de boue noire avait pendant ces 9 heures consécutives une température moyenne de 52°C., avec

une température maximum de 62°C. et une température minimum de 44°C. Il est évident, que les températures dans le flacon contenant de la boue grise sont moins élevées: la température moyenne y était de 46°C., la température minimum de 38° et la température maximum de 60°C. Pour les autres jours, des remarques à peu près identiques peuvent être faits et démontrent que ces températures sont en tout cas *assez élevées pour laisser croître les bactéries thermophiles et persistent assez longtemps pour que beaucoup de générations de bactéries puissent se développer.*

Naturellement un temps relativement court suffit pour donner des quantités considérables de bactéries: en ensemençant des spores de bactéries thermophiles dans un tube de bouillon-gélose enveloppé de papier noir, et placé ensuite au soleil, on y voit après 3—6 heures, des colonies épaisses de la bactérie thermophile.

Sous l'influence directe du soleil, des températures aussi élevées, que celles constatées dans les flacons — où, je le rappelle, se trouvait une quantité de liquide considérable — se rencontrent fréquemment, cela va sans dire, dans les couches superficielles du sol, dans des flaques d'eau, sous des feuilles tombées, etc.

Les plus grandes étendues d'eau stagnante ou à peu près stagnante, comme les champs de riz inondés (sawahs), peuvent, elles aussi, avoir des températures très élevées. J'ai lu un jour, sur un thermomètre placé dans une petite rivière, une température de 48°C. à 11 heures du matin.

De ce qui précède, je crois qu'il ressort assez clairement, que les bactéries thermophiles peuvent, dans les contrées tropicales, croître assez bien dans les couches superficielles du sol et qu'elles y font normalement partie de la flore microbienne. Mais quel rôle jouent-elles dans l'économie de la nature?

En comparant les températures de croissances maximum, optimum et minimum des bactéries ordinaires du sol, isolées soit en Europe, soit sous les Tropiques, je pus démontrer que ces températures sont absolument les mêmes pour les espèces identiques, mais de provenances si différentes. Un résultat semblable est mentionné par Bredemann (3) pour les différentes formes de son *Bacillus amylobacter* A.M., et Bredemann, isolées soit de sols des Tropiques, soit de sols de régions plus froides. *Il ne saurait donc être question d'une adaption des bactéries aux températures moyennes plus élevées des pays chauds.*

Des chiffres donnés dans le tableau ci-dessus, on peut conclure que la température moyenne des couches superficielles de la terre, de l'eau, etc, dans les contrées tropicales, est en tout cas plus élevée que la température maximum de la plupart des bactéries psychrophiles.

Pendant une grande partie du jour, s'il n'y avait que des bactéries psychrophiles, il n'y aurait, dans ces couches superficielles, pas de vie microbienne et les procès de décomposition et d'humification seraient supprimés pendant les heures chaudes du jour. Pour le 24 Août par exemple, pendant au moins 9 heures sur 24, les procès de décomposition et d'humification seraient absolument supprimés. Cependant, dans les Tropiques, ces procès se font bien plus rapidement qu'en Europe, ce qui serait en opposition avec la proposition énoncée ci-dessus.

Remarquons que, lorsque la température approche du maximum de croissance des bactéries psychrophiles, l'activité de celles-ci diminue, mais qu'en même temps la température atteint le point minimum de croissance des bactéries thermophiles; et nous devons admettre que celles-ci jouent alors le rôle des bactéries psychrophiles et que, pour cette raison, la décomposition, et l'humification continuent normalement.

Que les bactéries thermophiles jouent ce rôle, cela ressort déjà de leur large distribution dans la nature tropicale, mais en outre cela peut se démontrer par les expériences suivantes.

La décomposition de l'amidon et celle de la peptone étaient très propres à prouver l'action décomposante des bactéries thermophiles. Des fioles, contenant 50 c.c. d'une solution de 1% de peptone avec 5 grammes de sol, furent placées dans des thermostats pendant 72 heures à des températures de 30°, 37°, 40°, 47°, 55°, 60° et 70° C. Après ces 72 heures de culture, l'ammoniac formé fut distillé et titré. Naturellement, j'avais pris toutes les précautions pour empêcher la perte d'ammoniac. Une des expériences donna les résultats suivants:

Température	30°	37°	40°	47°	55°	60°	70°
Ammoniac formé en c.c. $\frac{1}{10}$ N.	22,8	27,6	29,8	22,3	27,3	28,0	9,6

Des expériences avec des sols de provenances diverses donnaient des résultats analogues: il est évident que la quantité d'ammoniac obtenu avec un sol fertile, était bien plus grande, qu'avec un sol pauvre.

Sur un point spécialement les sols de provenances si diverses donnaient des résultats analogues: la quantité d'ammoniac libérée à la température de 47°C. était bien moindre que celle libérée aux températures voisines de 55°C. et de 40°C. La cause de cette divergence est bien claire: aux températures de 40°C., les bactéries psychrophiles sont encore à peu près en pleine activité, de même les bactéries thermophiles à la température de 55°C.; mais à 47°C., la température est trop élevée pour les bactéries psychrophiles et encore toute voisine de la température minimum des bactéries thermophiles, de telle sorte que ni les unes, ni les autres ne sont en pleine activité.

Les solutions de caséine donnent des résultats analogues.

A 70°C. la quantité d'ammoniac libéré est bien moindre, mais il faut se souvenir qu'à cette température, les alcalis forts travaillent plus énergiquement sur les cellules et les tuent plus vite: une concentration d'ammoniac bien plus faible est, déjà à cette température, plus nuisible à la croissance qu'à des températures de 60°C.

La quantité de bactéries thermophiles diminue dans le sol avec la profondeur. Aussi longtemps qu'on y trouve encore des bactéries psychrophiles, on y trouve aussi des bactéries thermophiles. Il est clair que les bactéries thermophiles ne jouent plus aucun rôle dans les couches plus profondes.

J'ai analysé deux échantillons de sol: le premier pris à la surface, le second pris à une profondeur de 30 c.M.; dans la solution de peptone, à des températures variées, j'ai obtenu les résultats suivants:

Températures	30°	37°	40°	47°	55°	70°
Cc. d'ammoniac $\frac{1}{10}$ N libéré en 72 heures	22,5	28,8	27,2	16,6	19,2	6,2
Echantillon pris à la surface						
Echantillon pris à 30 cm. de prof.	15,8	24,0	21,0	8,1	10,4	2,9

Description des bactéries isolées.

Comme je l'ai dit ci-dessus, mon intention n'est pas de donner la description de toutes les bactéries isolées. Je n'en décrirai ici qu'une dizaine. Dans une publication ultérieure, j'espère donner plus de détails, spécialement sur deux des groupes: les *Lipobacter* thermophiles et les bactéries thermophiles dénitrifiantes.

Bacterium No. 1.

Isolé du sol à 60°C. Sur la gélose de viande, cette bactérie forme à 60°C., après un temps de culture de 24 heures, des colonies blanches avec un centre très distinct et avec un bord de forme irrégulière. Ne croît pas sur la pomme de terre. Les cultures dans le bouillon de viande sont régulièrement troubles et ont un précipité visqueux. Ne sécrète pas de diastases. Ne forme pas de nitrites.

Bâtonnets longs de $2-2\frac{1}{2}\mu$ et larges de $0,4 \mu$; réunis en longs filaments. Les spores sont placées au bout du bâtonnet et sont ovales; elles sont tuées après $5\frac{1}{2}-6$ heures dans l'eau à 100°C.

Optimum de croissance: 60°; maximum: 70°C et minimum 37°C.

Bacterium No. 2.

Isolé du sol de l'est de Java à une température de 60°C. Sur la gélose de viande, colonies blanches, visqueuses, dont la surface est ondulée. Ne croît pas sur la pomme de terre. Sécrète les diastases suivantes: amylase et trypsine. Forme des nitrites. Au bout des bâtonnets, les spores rondes ont $0,8-1,0\mu$ de dia-

mètre. Les bâtonnets sont longs de $3-4\mu$ et larges de $0,8\mu$. Les spores sont tuées en $6\frac{1}{2}-7$ heures dans l'eau bouillante.

Optimum de croissance: 65°C .; maximum: 73°C et minimum: 45°C .

Bacterium No. 3.

Les cultures dans bouillon de viande sont régulièrement troubles. Il se forme à 58°C . un voile. Sur la gélose de viande, colonies blanches, visqueuses. Forme des nitrites. Sécrète de la trypsine et de la caséase. Les bactéries sont des bâtonnets longs de $3,5-5\mu$ et larges de $0,5\mu$ et forment des filaments. Les spores, situées au bout du bâtonnet sont rondes, avec un diamètre de $1\frac{1}{2}\mu$. Elles sont tuées dans l'eau bouillante en $6\frac{1}{2}$ heures,

Optimum de croissance: 60°C .; maximum: 70°C . et minimum: 38°C .

Bacterium No. 4.

Sur la gélose de viande, il forme des colonies transparentes; qui se dispersent sur la gélose. Ne croît pas sur la pomme de terre. Ne forme pas de nitrites. Sécrète les diastases suivantes: amylase, trypsine et caséase. Les bâtonnets sont longs de 4μ et larges de 1μ . Les spores, situées au bout du bâtonnet, lui donnent une apparence capitée; elles sont ovales, longues de $1\frac{1}{2}$. En 8 heures, les spores sont tuées par l'eau bouillante.

Optimum de croissance: 63° ; maximum: 72° et minimum: 43° .

Bacterium No. 5.

Les cultures sur pomme de terre sont colorées en violet et sont un peu visqueuses. Sur la gélose de viande, la bactérie forme des colonies opaques de forme irrégulière. Ne sécrète pas de diastases. Ne forme pas de nitrites. Dans le bouillon elle donne des filaments longs. Les bâtonnets sont longs de $3-4\mu$ et larges de $0,4\mu$. Les spores sont placées à l'extrémité des bâtonnets, elles sont ovales, et tuées en $6\frac{1}{2}$ heures dans l'eau bouillante.

Optimum de croissance: 60°C .; maximum: 67°C . et minimum: 39°C .

Bacterium No. 6.

Sur la gélose de viande, colonies transparentes, visqueuses. Ne croît pas sur pomme de terre. Sécrète de la trypsine et de

l'amylase. Forme des nitrites. Les bactéries, longues de $3-4\mu$ et larges de $0,6\mu$, forment, au bout des bâtonnets, des spores ovales, longues de 1μ . Les spores sont tuées en $4\frac{1}{2}$ heures dans l'eau bouillante.

Optimum de croissance: $65^{\circ}\text{C}.$; maximum: $73^{\circ}\text{C}.$ et minimum: $35^{\circ}\text{C}.$

Bacterium No. 7.

Sur la gélose de viande, colonies transparentes, visqueuses. Sur la pomme de terre colonies blanches, épaisses. Sécrète de la trypsine. Ne forme pas de nitrites. Les bactéries sont longues de $4-5\mu$ et larges de $0,4\mu$ et forment des filaments. Les spores rondes, placées au bout des bâtonnets, ont un diamètre de $0,8\mu$. Elles sont tuées dans l'eau bouillante en $5\frac{1}{2}-6$ heures.

Optimum de croissance: 55° maximum: $70^{\circ}\text{C}.$ et minimum $35^{\circ}\text{C}.$

Bacterium No. 8.

Sur la gélose de viande, grandes colonies transparentes, qui s'étendent finalement sur toute la surface de la gélose. Sur la pomme de terre, il ne croît que très faiblement et forme des colonies blanches, non visqueuses. Sécrète de la trypsine. Ne forme pas de nitrites. Bâtonnets longs de $3-4\mu$ et larges de $0,9\mu$, spores ovales, situées au milieu des bâtonnets. Sur le bouillon, un voile mince se forme. Les spores sont tuées en $7\frac{1}{2}$ heures dans l'eau bouillante.

Optimum de croissance: $58^{\circ}\text{C}.$; maximum: $70^{\circ}\text{C}.$ et minimum: $39^{\circ}\text{C}.$

Bacterium No. 9.

Ne croît pas sur la pomme de terre. Sur gélose de viande, colonies épaisses avec un bord transparent, ondulé. Le centre des colonies est ponctué. Sécrète de la caséase. Forme des nitrites. Les bâtonnets sont longs de 4μ et larges de $0,4\mu$ avec des spores ovales, longues de $0,5\mu$ et placées à l'extrémité des bâtonnets. Elles sont tuées en 7 heures dans l'eau bouillante.

Optimum de croissance: $60^{\circ}\text{C}.$; maximum: $67^{\circ}\text{C}.$ et minimum $38^{\circ}\text{C}.$

Bactérium No 10.

Ne croît pas sur la pomme de terre. Colonies blanches

brillantes à contour net sur la gélose de viande. Forme des nitrites et sécrète de l'amylase. Bâtonnets longs de 5μ et larges de 1μ . Spores rondes, avec un diamètre de $1\frac{1}{2}\mu$, situées au milieu des bâtonnets. Les spores sont tuées après 5 heures dans l'eau bouillante.

Optimum de croissance: 60°C .; maximum: 68°C et minimum: 38°C .

R É S U M É.

- 1 Les bactéries thermophiles sont très abondantes sous les Tropiques, non seulement quant au nombre des individus, mais aussi quant à la quantité des espèces.
 - 2 Les températures des couches superficielles du sol, des flaques d'eau, etc. sont d'ordinaire assez élevées pour rendre possible, pendant plusieurs heures consécutives, la croissance des bactéries thermophiles.
 - 3 Les bactéries thermophiles sécrètent des diastases, qui ne sont nullement tuées par les températures élevées, auxquelles les bactéries croissent.
 - 4 Quand la température des couches superficielles du sol devient trop élevée pour les bactéries psychrophiles, les bactéries thermophiles entrent en jeu et prennent alors leur rôle de décomposer les matières organiques.
-

Index bibliographique.

- 1 *Beyerinck*, Ueber olichonitrophiele Bakterien.
Centralblatt für Bakteriologie u.s.w. 2 Abt. Band 7 pag. 561.
- 2 *Blau*, Ueber die Temperaturmaxima der Sporenkeimung und der Sporenbildung, sowie die supramaximalen Tötungszeiten der Sporen Bakterien, auch derjenigen mit hohen Temperaturminuima.
Centralblatt für Bakteriologie u.s.w. 2 Abt. Band 15 pag. 97.
- 3 *Bredemann*, Bacillus amylobacter A.M. et B.
Bentralblatt für Bakteriologie u.s.w. 2 Abt. Band. 23 pag. 387.
- 4 *Fuhrmann*, Vorlesungen über Bakterienenzymen. 1907.
- 5 *Globig*, Ueber Bakterienwachstum bei 50°—70°C.
Zeitschrift für Hygiene 1888 pag. 294.
- 6 *van Iterson*, Anhäufungsversuche mit denitrifizierenden Bakterien.
Centralblatt für Bakteriologie u.s.w. 2 Abt. Band 12 pag. 106.
- 7 *de Kruyff*, Les microbes à amylase.
Bulletin du Département de l'Agriculture aux Indes-Néerlandaises. No. III 1906.
- 8 *de Kruyff*, Les bactéries hydrolysant et oxydant les graisses.
Bulletin du Département de l'Agriculture aux Indes-Neerlandaises No. IX pag 1907.
- 9 *Arthur Meyer*, Mikroskopisches Practicum 1903 pag. 127.
- 10 *Miehe*, Die Selbsterhitzung des Heus. Eine biologische Studie, 1907.
- 11 *Miquel*, Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour 1881.
Pag. 464.
- 12 *Rabinowitz*, Ueber die thermophielen Bakterien.
Zeitschrift für Hygiene 1895 pag. 154.
- 13 *Sames*, Zur Kenntniss der bei höherer Temperatur wachsenden Bakterien- und Streptothrixarten.
Zeitschrift für Hygiene 1900 pag. 313.
- 14 *Winogradsky*, Comptes rend. de l'Académie 1893 Band 116
pag. 1385.

Laboratoire de Microbiologie
du
Département de l'Agriculture.
Buitenzorg.

Juillet 1909.

Quelques remarques sur des bactéries aérobies, fixant l'azote libre de l'atmosphère, dans les Tropiques.

PAR

E. DE KRUIJFF

BACTÉRIOLOGUE.

En 1907, je publiai mes recherches sur une bactérie aérobie, fixant l'azote libre de l'atmosphère, isolée des échantillons de terre de l'île de Krakatau. (1) Cette bactérie, nommée *Bacterium Krakatauï*, se trouvait dans tous les échantillons en quantité assez considérable, tandis que l'*Azotobacter chroococcum*, si commun dans les régions plus froides de la terre, y faisait totalement défaut. Ce fait si intéressant me poussa à entreprendre une recherche systématique d'échantillons de terre, recueillis dans toute l'île de Java et à y rechercher la présence de bactéries oligo-nitrophiles. Ces recherches sont maintenant provisoirement terminées et elles ont donné des résultats suffisamment importants pour que j'aie jugé nécessaire de les publier ci-dessous.

J'ai recherché, en utilisant la solution de mannite de Beyerinck, la présence éventuelle de ces bactéries en tout sur plus de 100 échantillons de terre et d'eau. De temps en temps, je faisais des expériences avec des solutions nutritives où la mannite était remplacée par d'autres nutriments hydrocarbonés, mais les résultats étaient toujours les mêmes. Toutes les expériences avaient lieu à la température ordinaire du laboratoire c'est-à-dire à 26—28 C.

Dans les plupart des expériences, il était impossible d'isoler à partir de cultures impures dans des solutions de mannite par ensemencement direct sur des plaques de gélose-mannite, la ou les bactéries oligo-nitrophiles; il était nécessaire d'ensemencer de nouveau dans une solution de mannite.

Le *Micrococcus* décrit à la fin de cette publication sous le No. 1 faisait exception à cette règle et se développait si vite que les autres bactéries disparaissaient devant sa rapide croissance. A partir des colonies pures isolées sur les plaques de gélosemannite, je pus faire des ensemencements direct dans des Erlemeyers

avec la solution de mannite. Après un temps de culture variable, les Erlemeyers furent analysés et la quantité d'azote dans le liquide fut déterminée suivant la méthode de Kjehtdal.

La première conclusion que je pus tirer de ces expériences fut que l'*Azotobacter chroococcum*, la bactérie oligo-nitrophile par excellence dans les régions plus froides de la terre, est très rare sous les Tropiques. Cinq échantillons seulement donnèrent le voile caractéristique à la surface des liquides nutritifs. Il est bien curieux de constater que ces cinq échantillons provenaient de l'ouest de Java; je n'ai jamais isolé cet *Azotobacter* des échantillons de l'est de Java.

Dans toutes les autres cultures, la fixation de l'azote libre de l'atmosphère était opérée par des microbes aérobés de différentes espèces nouvelles.

J'ai isolé une douzaine d'espèces de ces organismes oligo-nitrophiles. La quantité d'azote fixée par la plupart d'entre eux fut toujours très faible. C'est pour cela que je ne donnerai ci-dessous que la description de trois des plus intéressantes.

Il va sans dire que, en même temps que j'isolais ces bactéries oligo-nitrophiles, j'obtenais aussi en culture pure une très grande quantité de bactéries méso-nitrophiles. Je n'ai pas isolé jusqu'ici le *Radiobacter* B.A l'occasion de mes recherches sur les bactéries thermophiles, j'essayai aussi, mais sans succès, d'isoler des bactéries oligo-nitrophiles thermophiles.

Il est intéressant de relever ce fait que tous les organismes isolés étaient des aérobés facultatifs.

Description des bactéries isolés.

Micrococcus No. 1.

Ne croît pas sur la gélose de viande ni dans le bouillon de viande. Sur la gélose de mannite, il forme des colonies épaisses, très visqueuses, qui, en vieillissant, se colorent un peu en jaune. Ne dénitrifie pas et ne forme pas de nitrites à partir de nitrates. Les cultures dans la solution de mannite ne sont pas translucides et forment, après un temps de culture de 5 jours déjà, une masse visqueuse épaisse. Ne sécrète pas de diastases. L'optimum de croissance est 35°C.

La quantité d'azote fixée dans 200 c.c. d'une solution de mannite (2%) après un temps de culture de 9 jours est de 3,50

mg.. Dans une solution de glucose sous les mêmes conditions cette quantité est de 4,15 mg. En additionnant aux liquides de culture de l'azote combiné, on obtient des résultats négatifs: la quantité d'azote fixée par notre *Micrococcus* diminue. Par exemple: une addition de $2\frac{1}{2}$ mg. de chlorure d'ammonium donna, en 14 jour, une quantité d'azote fixée de 1,78 mg. seulement.

Un fait analogue est mentionné par Krzemieniński (2) pour l'*Azotobacter chroocum*.

Ce *Micrococcus* no. 1 a des cellules d'un diamètre de $1\frac{1}{2}$ — 2μ , qui sont entourées d'une couche épaisse de gelée. Dans les cultures on les trouve souvent groupées par deux. Il ne forme pas de spores. Dans les liquides nutritifs de composition diverses il ne forme jamais de voile.

Bacterium No. 2.

Sur la gélose de viande, il forme des colonies rondes, colorées en jaune, qui ne sont que très peu visqueuses. Petits bâtonnets, mobiles, longs de 2μ et large de $0,3\mu$. Ne forme pas de spores. Ne dénitrifie pas et ne forme pas de nitrites. Optimum de croissance à 38°C ., maximum à 43°C . Sécrète de la lipase et de la trypsine. Ne fermente pas le bouillon-glucose. Sur la gélose de mannite, forme des colonies blanches, opaques. Les cultures dans le bouillon de viande sont troubles et déposent un précipité sur le fond des fioles.

Les cultures dans 200 c.c. d'une solution de mannite de 2% fixent en 21 jours 1,50 m.g. d'azote et dans une solution de glucose sous les mêmes conditions une quantité de 1,45 mg. L'addition de terre stérilisée a une influence très nette sur le pouvoir fixateur d'azote: une solution de 2% de mannite additionnée de $\frac{1}{2}$ gr. de terre stérilisée fixe en 14 jours 5,72 mg. d'azote.

L'addition des sources d'azote combiné comme les sels d'ammonium produit le même effet que chez le *Micrococcus* No. 1.

Bacterium No. 3.

Sur la gélose de viande, forme des colonies blanches, épaisses, visqueuses. Ne fermente pas le bouillon-glucose. Ne dénitrifie pas et ne forme pas de nitrites. Sur la gélose de mannite, forme des colonies blanches, visqueuses. Bâtonnets immobiles, longs de $1,7\mu$ et large de $0,4\mu$. Ne forme pas de spores. Sécrète de

la trypsine et de la lipase. La température optimum de croissance est 40°C.

La quantité d'azote fixée dans 200 c.c d'une solution de mannite de 2‰ varie de 0,85 à 1,66 mg.

Résumé de la fixation d'azote libre de l'atmosphère par les bactéries décrites ci-dessus.

MICROCOCCUS No. 1.	Durée de l'expérience.	Azote total en mg.	Analyse témoin.	Azote fixé en mg
Solution de mannite	9	4,65	1,15	3,50
Solution de glucose	9	5,29	1,14	4,15
Solution de mannite plus 2½ mg de NH ₂ Cl.	9	3,63	1,85	1,78
BACTERIUM No. 2				
Solution de mannite	21	2,65	1,15	1,50
Solution de glucose	21	2,59	1,14	2,59
Solution de mannite plus ½ Gr. de terre stér.	21	9,31	3,59	5,72
BACTERIUM No. 3.				
Solution de mannite No. 1	14	2,00	1,15	0,85
Solution de mannite No. 2	14	2,80	1,15	1,66

(1) Bulletin du Département de l'Agriculture aux Indes néerlandaises Microbiologie No. 2 1907.

(2) Centralblatt f. Bakteriologie u.s.w. 2 Abt. Band 23 pag. 169.

